

学校编码: 10384
学号: 20620101151501

分类号

密级
UDC

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

矿区沉积物中铬/砷形态转化的
微生物作用研究

Study on Microbe Mediated Transformation of Cr/As in
Sediments of the Mining Area

国家自然科学基金青年项目(40801195), 国家自然科学基金面上项目(41071302)

龚 丽 博

指导教师姓名: 王远鹏 副教授

专 业 名 称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2013 年 月

论文答辩时间: 2013 年 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2013 年 9 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

(☒)2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

摘要

目前我国很多地方都受到重金属铬（Cr）或砷（As）的严重污染，给人类健康和生存环境带来很大威胁，这也成为全球较严重的环境问题。本研究以云南曲靖铬渣堆周边污染沉积物和湖南石门雄黄矿废弃矿区周边砷污染沉积物为研究对象，研究典型低分子有机碳对沉积物中 Cr/As 形态转化的影响，并利用 PCR-DGGE 和 Real-Time PCR 分析沉积物中微生物群落结构和功能微生物的丰度；利用稳定性同位素核酸探针技术（DNA-SIP）分析了乙酸钠作为底物情况下，硫酸盐还原菌（SRB）数量的变化；另外还研究了不同纳米颗粒对沉积物中铬还原及微生物种群变化的影响。本研究主要结论如下：

1. 沉积物中 Cr/As 的迁移转化主要是由微生物的活动引起的，外加典型低分子有机碳作为电子供体对其有明显促进作用。不同有机碳对 Cr(VI) 的还原效果有所差异，其大小顺序为：乳酸钠>丙酸钠>葡萄糖>乙酸钠>丁酸钠。不同有机碳对沉积物中 As 的释放量约为 2200-2600 $\mu\text{g/L}$ ，并且释放的 As 基本全部是以 As(III) 的形式存在，不同有机碳对 As 释放能力大小顺序为：丙酸钠>丁酸钠>葡萄糖>乙酸钠>乳酸钠。

2. 外加纳米颗粒促进了沉积物中 Cr(VI) 的还原，在未添加任何电子供体情况下，纳米 Fe_2O_3 、 Fe_3O_4 和 SiO_2 促进微生物利用沉积物本身具有的电子供体将 Cr(VI) 的还原，而非纳米颗粒对 Cr(VI) 的还原没有促进作用。

3. 沉积物中主要的微生物种群为变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门等。变形菌在 Cr/As 的迁移转化过程中有潜在的促进作用，有机碳和纳米颗粒使变形菌的种类和丰度增加。沉积物中含有丰富的 SRB，对沉积物中 Cr/As 的迁移转化起到一定促进作用；SRB 可以利用乙酸钠为底物使其富集。

本研究在一定程度上揭示了微生物利用沉积物中电子供体等物质对 Cr/As 进行迁移转化，为进一步研究 Cr/As 的迁移转化以及修复提供参考依据。

关键词：沉积物；Cr/As；有机碳；纳米颗粒；PCR-DGGE；Real-Time PCR；SRB

Abstract

In China, there are many places severely polluted by Chromium or Arsenic. Heavy metal contamination has become a concern worldwide. In present study, Cr and As polluted sediments were collected from chromium-containing slag heap in Qujing, Yunnan province and Realgar mine tailing area in Shimen, Hunan province. The effects of different low molecular organic carbons on Cr/As transformation in sediments were investigated, and the effects of different nanoparticles on Cr transformation were also explored. Then the dominant bacterial community and the enrichment of microorganisms in sediment were analyzed by PCR-DGGE and Real-Time PCR. Finally, the effect of acetate on Sulfate Reduction Bacteria (SRB) was studied by DNA based stable isotope probing (DNA-SIP). The results are as follows:

1. Microorganisms played an important role in Cr/As transformation in sediments. It was promoted by the electron donors. The rate of Cr(VI) reduction in sediment adding different organic carbons was different, which represented an identical order: sodium lactate> propionate sodium> glucose> sodium acetate> sodium butyrate. The released As(III) was the predominant form and were as high as 2200-2600 $\mu\text{g/L}$. The released arsenic represented an identical order: sodium propionate>sodium butyrate>glucose>sodium acetate>sodium lactate.

2. Fe_2O_3 , Fe_3O_4 and SiO_2 nanoparticles promoted Cr(VI) reduction by microorganisms in sediment while the corresponding non-nanoparticles had no significant effect.

3. The main microbial communities were Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes. The enrichment and species of Proteobacteria that had a potential effect on Cr/As transformation in sediment were increased in sediment adding different organic carbon or nanoparticles. There was a large amount of SRB in sediment, which

had some effect on Cr/As transformation. And acetate could enrich SRB.

Through this study, the microorganisms could utilize electron donors in sediment to transform Cr/As to some extent, which could provide important references for future research on transformation and remediation of Cr/As.

Key words: Sediment; Heavy metal; Organic carbon; nanoparticles; PCR-DGGE, Real-Time PCR; SRB

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
第一章 前言.....	1
1.1 铬污染概述.....	1
1.1.1 铬及铬的来源.....	1
1.1.2 铬的危害.....	2
1.1.3 铬的形态及其迁移转化.....	3
1.2 砷污染概述.....	6
1.2.1 砷及砷的来源.....	6
1.2.2 砷的危害.....	7
1.2.3 砷的形态及其迁移转化.....	7
1.3 微生物对沉积物中铬/砷形态转化的影响.....	9
1.3.1 氧化还原作用.....	9
1.3.2 甲基化和去甲基化作用.....	10
1.3.3 生物吸附和富集作用.....	10
1.3.4 溶解作用.....	11
1.4 分子生物学方法在沉积物微生物中的应用.....	11
1.4.1 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) /温度梯度凝胶电泳 (TGGE)	11
1.4.2 末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP)	12
1.4.3 荧光原位杂交技术 (FISH)	13
1.4.4 实时荧光定量 PCR (Real-Time Quantitative PCR)	13
1.4.5 稳定性同位素核酸探针技术(DNA-SIP).....	15
1.5 课题背景与主要内容.....	15
1.5.1 课题背景与意义.....	15
1.5.2 课题主要研究内容.....	16
第二章 实验材料与方法.....	17
2.1 实验材料.....	17
2.1.1 铬样品.....	17
2.1.2 砷样品.....	17
2.2 实验仪器与设备.....	17
2.3 实验试剂.....	17
2.4 测定分析方法.....	17
2.4.1 溶液中 Cr(VI)的测定.....	17
2.4.2 沉积物中总铬的测定.....	19

2.4.3 沉积物中水溶性 Cr(VI)测定	19
2.4.4 溶液中总砷测定	19
2.4.5 溶液中 As(III)和 As(V)的测定	20
2.4.6 沉积物中总砷的测定	22
2.4.7 溶液中 Fe(II)的测定	22
2.5 微生物群落结构和含量分析	23
2.5.1 总 DNA 的提取	23
2.5.2 PCR 扩增	23
2.5.3 变性梯度电泳 (DGGE) 分析	24
2.5.4 DNA 片段回收、克隆及测序	24
2.5.5 系统发育树构建	25
2.5.6 ¹³ C-DNA 分离	25
2.5.7 Real-Time Quantitative PCR 分析	25
第三章 有机碳对沉积物中 Cr/As 的迁移转化及微生物分析	32
3.1 样品处理及微生物分析	32
3.1.1 铬沉积物处理	32
3.1.2 砷沉积物处理	33
3.1.3 DNA-SIP 样品处理	33
3.1.4 微生物组成与含量分析	34
3.2 结果分析与讨论	34
3.2.1 不同有机碳对铬迁移转化的影响	34
3.2.2 不同有机碳对砷释放的影响	36
3.2.3 铬沉积物中微生物组成分析	39
3.2.4 砷沉积物中微生物组成分析	42
3.2.5 铬沉积物中功能微生物含量分析	45
3.2.6 砷沉积物中功能微生物含量分析	47
3.2.7 SRB 对乙酸钠的利用分析	49
3.3 本章小结	51
第四章 纳米颗粒对沉积物中铬的转化及微生物分析	53
4.1 样品处理及微生物分析	54
4.1.1 不同纳米颗粒处理	54
4.1.2 不同非纳米颗粒处理	54
4.1.3 微生物组成与含量分析	55
4.2 结果分析与讨论	55
4.2.1 纳米颗粒对铬迁移转化的影响	56
4.2.2 非纳米颗粒对铬迁移转化的影响	57
4.2.3 微生物组成分析	59
4.2.4 功能微生物含量分析	63
4.3 本章小结	65

第五章 结论与建议.....	66
5.1 结论	66
5.2 创新点	67
5.3 建议	67
参考文献.....	68
附录	77
在读期间研究成果	81
致谢	82

CONTENTS

Chinese Abstract	I
English Abstract	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 An overview of chromium pollution.....	1
1.1.1 Chromium and its source	1
1.1.2 Hazard of chromium	2
1.1.3 Forms and transformation of chromium	3
1.2 An overview of arsenic pollution	6
1.2.1 Arsenic and its source	6
1.2.2 Hazard of arsenic	7
1.2.3 Forms and transformation of arsenic	7
1.3 Microorganisms effect on Cr/As in sediment.....	9
1.3.1 Oxidation-reduction	9
1.3.2 Methylation and demethylation	10
1.3.3 Biosorption and concentration	10
1.3.4 Dissolution.....	11
1.4 Molecular biology method used in microbial of sediment	11
1.4.1 Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)/temperature gradient gel electrophoresis (TGGE)	11
1.4.2 Terminal restriction fragment length polymorphism(T-RFLP)	12
1.4.3 Fluorescent in situ hybridization (FISH)	13
1.4.4 Real-Time Quantitative PCR(Real-Time PCR).....	13
1.4.5 DNA based stable isotope probing(DNA-SIP).....	15
1.5 Background and main contents of this thesis.....	15
1.5.1 Background and Significance	15
1.5.2 Main contents	16
Chapter 2 Materials and methods	17
2.1 Samples	17
2.1.1 Chromium sample.....	17
2.1.2 Arsenic sample.....	17
2.2 Instruments and equipments	17
2.3 Reagents and materials	17
2.4 Analytical method	17
2.4.1 Determine of Cr(VI) in solution	17
2.4.2 Determine of total Cr in sediment	19
2.4.3 Determine of water-solubility Cr(VI) in sediment	19

2.4.4 Determine of total As in solution.....	19
2.4.5 Determine of As(III) and As(V) in solution.....	20
2.4.6 Determine of total As in sediment	22
2.4.7 Determine of Fe(II) in solution.....	22
2.5 Microbial community and enrichment analysis	23
2.5.1 DNA extract.....	23
2.5.2 PCR amplification	23
2.5.3 DGGE analysis	24
2.5.4 DNA recovery, clone and sequencing.....	24
2.5.5 Phylogenetic tree construction.....	25
2.5.6 ¹³ C-DNA separation.....	25
2.5.6 Real-Time Quantitative PCR analysis	25
Chapter 3 Effect of organic carbon on Cr/As transforamtion in sediment and microbial analysis.....	32
3.1 Sample treatment and microbial analysis	32
3.1.1 Treatment on Cr-sediment	32
3.1.2 Treatment on As-sediment	33
3.1.3 Sample treatment for DNA-SIP.....	33
3.1.4 Microbial community and enrichment analysis.....	34
3.2 Results and discussion	34
3.2.1 Effect of different organic carbon on Cr transformation	34
3.2.2 Effect of different organic carbon on As release	36
3.2.3 Microbial community analysis in Cr-sediment.....	39
3.2.4 Microbial community analysis in As-sediment	42
3.2.5 Functional microbial enrichment analysis in Cr-sediment	45
3.2.6 Functional microbial enrichment analysis in As-sediment.....	47
3.2.7 Analysis of SRB utilizing sodium acetate	49
3.3 Summary	51
Chapter 4 Effect of nanoparticles on Cr transforamtion in sediment and microbial analysis.....	53
4.1 Sample treatment and microbial analysis	54
4.1.1 Treatment with different nanoparticles.....	54
4.1.2 Treatment with different non-nanoparticles.....	54
4.1.3 Microbial community and enrichment analysis.....	55
4.2 Results and discussion	55
4.2.1 Effect of nanoparticles on Cr transformation	56
4.2.2 Effect of non-nanoparticles on Cr transformation	57
4.2.3 Microbial community analysis	59
4.2.4 Functional microbial enrichment analysis	63

4.3 Summary	65
Chapter 5 Conclusions and suggestions	66
5.1 Conclusions.....	66
5.2 Highlights	67
5.3 Suggestions	67
References.....	68
Appendix	77
Publications and patents.....	81
Acknowledgements.....	82

第一章 前言

随着工业的发展,越来越多的有毒重金属被排放到环境中,生态环境受到了严重的污染。2009 年,湖南 14000 吨铬渣非法转移,造成了周围土壤沉积物和地下水严重污染,部分村民中毒;据环保部的调查报道,我国因铬污染的地方多达 100 多处。另外重金属砷污染问题在许多国家都被报道,如美国、德国、中国、印度、孟加拉和墨西哥等,特别是孟加拉地区,世界卫生组织对饮用水的标准为 $10\text{ }\mu\text{g/L}$,而孟加拉地区约为 $50\text{ }\mu\text{g/L}$,甚至一些地区地下水砷含量达到 $2000\text{ }\mu\text{g/L}$ ^[1,2],目前发现在约 400 万口水井中,有 120 万口水井被砷污染,占 29%左右。据证实,在孟加拉地区有 7700 万人遭受砷污染地下水的威胁^[3],有约 200 万人集体砷中毒,被认为人类历史上最大的中毒事件;我国矿产资源丰富,在矿物开采过程中产生的废渣和废水含有大量的砷,如贵州兴仁县境内煤矿的砷含量远高于标准量,达 $3.2\text{-}3.5\times 10^4\text{ mg/kg}$ ^[4],对周围环境产生极大破坏,中毒人数和面积在国内外也是罕见的。铬和砷作为对人体毒性最大的五毒元素(汞 Hg、镉 Cd、铅 Pb、铬 Cr 和砷 As)之二,其污染问题日益突出,受到人们的广泛关注。

1.1 铬污染概述

1.1.1 铬及铬的来源

铬(Chromium)是一种金属银色的过渡金属,它的化学符号是 Cr,原子序数 24,相对原子质量 51.996,在元素周期表中属VIB 族,在地壳元素中含量居于 21 位,是由法国化学家沃克兰(L.N. Vauquelin)于 1797 年在西伯利亚红铅矿中首次被发现。由于铬具有坚硬和耐腐蚀等的性质,而被广泛的应用于金属加工、不锈钢制造、电镀、皮革制造、印染以及涂料等工业^[5]。

铬主要来源于岩石,在自然的作用下转移到成土母质以及土壤中,随着时间逐渐积累,并因成土母质不同而含量不同。污水灌溉、城市垃圾以及污泥是土壤和沉积物中铬的另一个主要来源,其中铬污染水灌溉是土壤和沉积物中铬的重要

来源。近年来,由于城市工业化的迅速发展,大量的废水涌入河道,特别是一些未处理或处理不合格的废水,从而使水中含有大量铬,随着灌溉后污染土壤和沉积物,灌溉后的铬只有 0.28~15% 能够被作物吸收,而 85%~95% 的铬会在土壤和沉积物中累积^[6];污泥是有价值的植物营养物质来源,对土壤整体稳定性具有有益的影响,但是有些电镀厂污泥中铬的含量可高达几万 ppm,长期大量施用于农田,将会显著提高土壤和沉积物中铬的含量^[7]。铬渣堆放以及被铬污染的地下水也是沉积物铬污染的一个重要来源,通常,每生产 1 吨金属铬大约会排放 10 吨铬渣,每生产 1 吨铬盐会排放 2.5~3 吨的高毒性铬渣^[8],我国有 20 多个省市排放铬渣,共计 600 万吨,污染面积甚广。此外,从铬工业区吹来的含铬粉尘颗粒、汽车排放的尾气以及汽车轮胎的磨损产生的有害气体和粉尘等,经自然沉降和雨淋沉降也可进入沉积物。

1.1.2 铬的危害

铬具有明显的三致作用,也是工业污染的重要指标之一。金属铬没有毒性;Cr(III)是铬的最稳定的形态,在肠胃中不易吸收,并且容易与皮肤表层的蛋白质结合为稳定的络合物,因此毒性不大;但是,Cr(VI)的毒性是 Cr(III)的 100 倍,因此铬的毒性主要来自于 Cr(VI)。铬对消化道和呼吸道有刺激作用,还有致癌和诱变作用;Cr(VI)更容易穿透细胞膜而进入细胞,并在细胞内的谷胱甘肽等还原性物质的作用下还原成 Cr(III),在还原过程中会产生 Cr(IV)和 Cr(V)的中间体以及活性氧自由基(或羟基自由基),这些物质可以和 DNA 作用造成 DNA 解旋或断裂^[9],因此铬具有强毒性。

当空气中 Cr(VI)浓度为 0.015~0.033 mg/m³时就可以引起呼吸系统炎症和鼻粘膜萎缩性、肥大性变化等。当浓度为 0.15~0.3 mg/m³时会引起鼻中隔穿孔,长期作用可引起肝硬化、肺气肿、及支气管扩张等,甚至引发癌症。长期接触铬酸盐,味觉和嗅觉可以减退以至消失,还会引起肠胃症状如胃痛、胃炎以及消化溃疡等。皮肤接触会造成皮炎和湿疹,造成长时期拖延而不愈。Cr(VI)还会导致温血动物的繁殖能力下降并能导致胚细胞染色体产生畸变。国际癌症研究机构(IARC)和美国政府工业卫生学家协会(ACGIH)都已经确认 Cr(VI)化合物具

有致癌性，并且人口服 Cr(VI)化合物致死剂量约为 1.5~1.6 g^[10]。过量的铬也会对植物有危害，它可以引起花叶症以及黄瓜瘤和菠萝瘤等；过量的铬还影响植物对营养物质的吸收，减弱植物的光合作用能力，抑制水稻、玉米和棉花等的生长以及小麦等种子萌发。

1.1.3 铬的形态及其迁移转化

自然界中的铬主要以两种稳定的氧化态的形式存在—Cr(III)和 Cr(VI)，有时也会有中间态 Cr(IV)和 Cr(V)出现，但是它们是极不稳定的^[11]。环境中的 Cr(VI)主要以 CrO_4^{2-} 和 HCrO_4^- 的形式存在，Cr(III)主要以 Cr^{3+} 、 $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$ 、 $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$ 、 $\text{Cr}(\text{OH})_3$ 和 $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$ 等形式存在。Cr(III)和 Cr(VI)的存在形式受 pH 的影响极大(见图 1-1)，Cr(VI)在中性和偏碱性环境中，主要以 CrO_4^{2-} 的形式存在，在偏酸性 (pH<6) 条件下以 HCrO_4^- 为主；而 Cr(III)在强酸性 (pH<4) 环境中，主要以 Cr^{3+} 的形式存在，而当 pH 为 4~5.5 时，Cr(III)主要以 $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$ 为主，当 pH 为 6.8~11.3 时，Cr(III)趋向于形成 $\text{Cr}(\text{OH})_3$ 沉淀，当 pH>11.3 时，Cr(III)则以 $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$ 的形式存在^[12]。

环境中的铬的迁移转化十分活跃(见图 1-2)，它可以在大气、水体、土壤沉积物和植物间迁移，铬在环境中的迁移转化主要是由氧化还原反应、沉淀、溶解、吸附和解析等物理化学过程或生物作用所决定的。沉积物中存在有许多活性组分，包括有机质、粘土矿物、铁、锰氧化物以及氢氧化物等物质，铬在其中易受沉积物颗粒运移、重金属与土粒间的各种物理和化学作用以及沉积物中的微生物作用的影响被吸附共沉淀或释放。因此沉积物的成分、孔隙率、含水率和 pH 等都会影响铬的迁移。陈锡钧等发现沉积物的粒度对铬的释放影响较大，颗粒较粗的沉积物中的铬易被释放^[13]，李英等研究了滩涂沉积物中腐殖酸对 Cr(VI)的吸附特性，结果发现，沉积物中腐殖酸对外源的 Cr(VI)具有一定的吸附净化作用，吸附量随着 Cr(VI)初始浓度的增加呈对数型曲线的趋势增加，但吸附率逐渐下降为 0 达到饱和；他们还发现腐殖酸对 Cr(VI)的吸附受 pH 的影响较大，酸性条件有利于腐殖酸对 Cr(VI)的吸附，而当 pH 达到 8 以后，Cr(VI)的吸附率接近于 0^[14]。

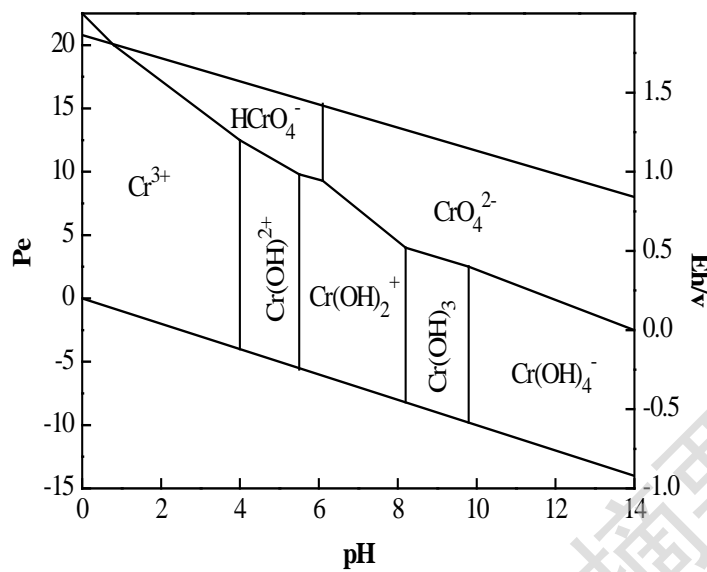


图 1-1 一定 pH 和 Eh 下水溶液中铬的热力学稳定图

Figure1-1 Thermodynamic stability of aqueous Cr species over a range of pH and Eh encountered in the surface environment

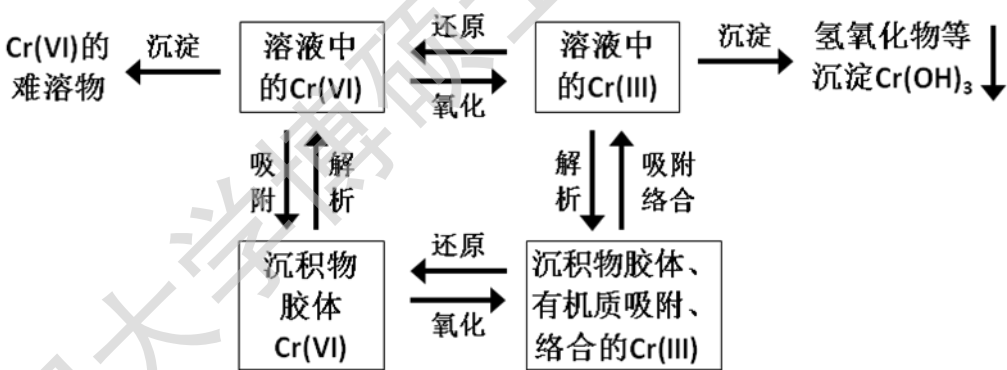


图 1-2 沉积物中不同形态铬的转化关系

Figure1-2 Transformation relationship among different Cr species in sediment

铬的转化主要包括两个方面，一是价态的转化，二是形态的转化。在一定 pH 和 Eh 条件下，Cr(III)和 Cr(VI)可以通过氧化还原反应相互转化。氧化还原作用是影响铬在沉积物中的存在形态和迁移转化的重要因素，当沉积物的氧化还原电位较高时，Cr(III)较易氧化成 Cr(VI)；在还原性环境中，Cr(III)容易与硫化物等形成不溶性的化合物，从而易被沉积物中黏土矿物所固定。在酸性介质中，Cr(VI)转化成 Cr(III)较易，因为 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 在酸性环境中是强氧化剂，一般的还原剂

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库